

Process for detecting evanescently excited luminescence

Patent number: DE69505370T
 Publication date: 1999-04-01
 Inventor: DANIELZIK BURKHARD (DE); DUVERNECK GERT (DE);
 HEMING MARTIN (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH);
 SEGNER JOHANNES (DE)
 Applicant: NOVARTIS AG (CH)
 Classification:
 - international: **G01N21/77; G01N21/77; (IPC1-7): G01N21/77;**
G01N21/64
 - european: G01N21/77B
 Application number: DE19956005370T 19950517
 Priority number(s): CH19940001643 19940527; WO1995IB00368 19950517

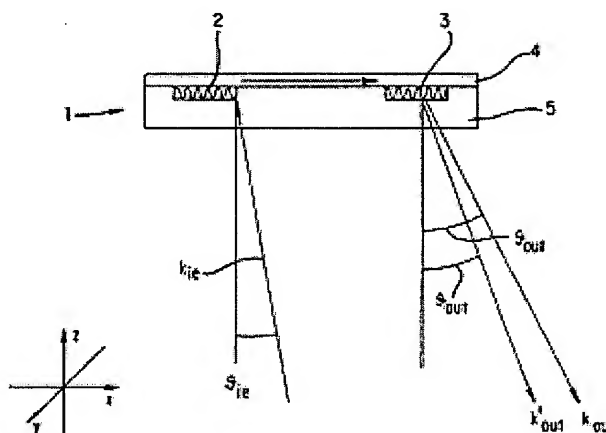
Also published as:

WO9533198 (A1)
 WO9533197 (A1)
 EP0760944 (A1)
 EP0759159 (A1)
 US5959292 (A1)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for DE69505370T
 Abstract of corresponding document: **US5822472**
 PCT No. PCT/IB95/00368 Sec. 371 Date Mar. 4, 1997 Sec. 102(e) Date Mar. 4, 1997 PCT Filed May 17, 1995 PCT Pub. No. WO95/33198 PCT Pub. Date Dec. 7, 1995 The invention relates to a process for determining luminescence with a planar dielectric optical sensor platform which consists of a transparent substrate to which a thin transparent waveguiding layer is applied, which sensor platform is provided with a coupling grating for the input-coupling of the excitation light and the refractive index of the substrate is lower than the refractive index of the waveguiding layer, by bringing a liquid sample as superstrate into contact with the layer, and measuring the luminescence produced by substances having luminescence properties in the sample, or by substances having luminescence properties immobilized on the layer, optoelectronically. The invention also relates to the use of the process in quantitative affinity sensing and to the use thereof for the quantitative determination of luminescent constituents in optically turbid solutions, and to sensor platform for carrying out the process.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

①⑦ **EP 0 759 159 B 1**

①⑩ **DE 695 05 370 T 2**

⑤① Int. Cl.⁸:
G 01 N 21/77
G 01 N 21/64

②①	Deutsches Aktenzeichen:	695 05 370,1
⑧⑤	PCT-Aktenzeichen:	PCT/IB95/00368
⑧⑥	Europäisches Aktenzeichen:	95 916 823.8
⑧⑦	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 95/33198
⑧⑥	PCT-Anmeldetag:	17. 5. 95
⑧⑦	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	7. 12. 95
⑧⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	26. 2. 97
⑧⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	14. 10. 98
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	1. 4. 99

③⑩ Unionspriorität:
1643/94 27. 05. 94 CH

⑦⑨ Patentinhaber:
Novartis AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Spott Weinmiller & Partner, 80336 München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,
NL, PT, SE

⑦② Erfinder:
DANIELZIK, Burkhard, D-55218 Ingelheim, DE;
DUVENECK, Gert, Ludwig, D-79189 Bad Krozingen,
DE; HEMING, Martin, D-55442 Stromberg, DE;
NEUSCHÄFER, Dieter, CH-4132 Muttenz, CH;
SEGNER, Johannes, D-55442 Stromberg, DE

⑤④ **VERFAHREN UND SENSOR ZUM NACHWEIS ABKLINGEND ANGEREGTER LUMINESZENZ**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 695 05 370 T 2

DE 695 05 370 T 2

Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung einer mit einer planaren, dielektrischen optischen Sensorplattform auf der Basis eines Wellenleiters evaneszent angeregten Lumineszenz. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Verfahrens in der quantitativen Affinitätssensorik sowie die Verwendung zur selektiven quantitativen Bestimmung lumineszierender Bestandteile in optisch trüben Lösungen. Weiterhin betrifft die Erfindung eine Sensorplattform, die zur Durchführung des Verfahrens geeignet ist.

Bei Lichtausbreitung in einem Wellenleiter ist die Lichtwelle nicht vollständig auf den eigentlichen Wellenleiter beschränkt, vielmehr breitet sich ein Teil der Welle im angrenzenden, optisch dünneren Medium aus. Dieser Anteil wird als evaneszentes Feld bezeichnet und ist die Grundlage für die Vielzahl der Anwendungen von optischen Wellenleitern in der Sensorik.

Insbesondere ist es möglich, mit dem evaneszenten Feld im optisch dünneren Medium Lumineszenzstrahlung anzuregen. Diese Anregung ist dabei auf die unmittelbare Umgebung zur Grenzfläche des Wellenleiters beschränkt. Daher ist diese evaneszente Lumineszenzanregung für analytische Anwendungen von großem Interesse.

Ein planarer Sensor besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Substrat, wellenleitende Schicht und Superstrat, das die zu untersuchende Probe im allgemeinen darstellt. Speziell für dünne Wellenleiter mit einer Dicke der wellenleitenden Schicht kleiner als die Lichtwellenlänge ist die Anzahl der ausbreitungsfähigen streubaren Moden des Lichtfeldes auf wenige diskrete Wellenleiter-Moden begrenzt.

Für dicke Wellenleiter kann eine Vielzahl von Moden geführt werden, in diesem Fall entfällt oft die Notwendigkeit eines Substrats, z.B. für Dicken im Bereich einiger 1/10 mm und größer.

Verfahren zum Nachweis evaneszent angeregter Lumineszenzstrahlung nach dem Stand der Technik können unterschieden werden nach der Auswahl der Strahlungsanteile, die nachgewiesen werden:

- Nachweis der „Volumenlumineszenz“: Ein Anteil der von der geführten Welle angeregten Fluoreszenzstrahlung wird in den vollen Raumwinkel emittiert, dieser kann über eine Optik erfaßt und einem Detektionssystem zugeleitet werden.
- Nachweis der „evaneszenten Lumineszenz“: Komplementär zu der in den Raum emittierten Lumineszenzstrahlung wird diese teilweise wieder als geführte Welle in den Wellenleiter eingekoppelt, dort transportiert und über die Endfläche des Wellenleiters ausgekoppelt.

Verfahren und Apparate zur Bestimmung der evaneszent angeregten Lumineszenz von mit Lumineszenzfarbstoffen markierten Antikörpern oder Antigenen sind bekannt und zum Beispiel in der US-A-4 582 809 beschrieben. Die dort beanspruchte Anordnung verwendet eine Faseroptik und Stirnflächenkopplung zur evaneszenten Lumineszenzanregung. Solche Faseroptiken haben typischerweise einen Durchmesser von bis zu einem Millimeter und leiten eine Vielzahl von Moden, wenn Laserlicht in sie eingekoppelt wird. Die evaneszent angeregte Lumineszenz kann in einfacher Weise nur durch den in die Faser rückgekoppelten Anteil gemessen werden. Die relativ großen Abmessungen der Vorrichtung und die Tatsache, daß vergleichsweise große Probenvolumina benötigt werden, sind weitere Nachteile. Die Anordnung läßt sich kaum wesentlich weiter verkleinern oder gar zu integrierten optischen Sensoren miniaturisieren. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit ist im allgemeinen mit einer Vergrößerung der Anordnung verbunden.

Ein weiterer Nachteil ist die durch die Stirnflächenauskopplung limitierte Empfindlichkeit: da Anregungs- und Lumineszenzlicht colinear laufen und durch Strahlteiler und Filter (z.B. Kanten- oder Bandpaßfilter) separiert werden müssen, begrenzt die Diskriminierungseigenschaft der Filtereinheit die Nachweisempfindlichkeit.

Die Verwendung dicker, planarer Multimode-Wellenleiter ist in D. Christensen, D. Deyer, D. Fowers, J. Herron, "Analysis of Excitation and Collection Geometries for Planar, Waveguide Immunosensors", SPIE 1886, 2 (1993) (Fiber Optic Sensors in Medical Diagnostics), beschrieben. Hier wird die Anregungsstrahlung über die Stirnfläche in den Wellenleiter eingekoppelt, detektiert wird die in den Raumwinkel emittierte Lumineszenzstrahlung. Alternativ kann auch eine Stirnflächen-Auskopplung verwendet werden. Im letzteren Fall ist analog zu den oben beschriebenen Anordnungen die Limitierung der Empfindlichkeit durch die notwendigen Strahlteiler und Filter von Nachteil. Weiterhin sind auch hier die großen Sensorabmessungen und damit verbundenen großen Probenvolumina nachteilig.

Auf der Basis dünner, planarer, vorzugsweise Monomode-Wellenleiter ist in der WO 90/08503 ein Verfahren zur Anregung der Lumineszenz über interne Totalreflexionsfluoreszenz (TIRF total internal reflection fluorescence) angegeben. Der Wellenleiter wird in diesem Verfahren zur Erhöhung der Lichtfeldstärke an der Sensoroberfläche verwendet, die Anregungsstrahlung wird von der Unterseite eingestrahlt und am Sensor totalreflektiert. Nachgewiesen wird die in den Raumwinkel abgestrahlte Volumenlumineszenz. Bei diesem Verfahren ist die Wechselwirkungszone zwischen Anregungsstrahlung und lumineszenzfähigen Molekülen auf dem Sensor begrenzt, da eine Anregung nur im Bereich des Strahldurchmessers stattfindet. Die Dimensionierung des Sensors ist daher nur begrenzt über den Strahldurchmesser wählbar, mit Einschränkungen in Durchmesser und Divergenz durch den sehr eng begrenzten Resonanzwinkel.

Der Einsatz von einem oder mehreren Koppelglittern zum Ein- und/oder Auskoppeln geführter Wellen nach dem Stand der Technik ist in K. Tiefenthaler und W. Lukosz, "Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors", J. Opt. Am. B6, 209 (1989), W. Lukosz, Ph.M. Nellen, Ch. Stamm, P. Weiss, "Output Grating Couplers on Planar Waveguides as Integrated, Optical Chemical Sensors", Sensors and Actuators B1, 585 (1990), und in T. Tamir, S.T. Peng, „Analysis and Design of Grating Couplers“, Appl. Phys. 14, 235-254 (1977), beschrieben. Die in Tiefenthaler et al. beschriebenen Verfahren sind für die Affinitäts-Sensorik bei Verwendung der direkten Nachweismethode (über die Brechzahländerung) nützlich: es wird die Verschiebung der Koppelwinkelresonanz bestimmt, die aufgrund der Brechzahländerung durch Adsorption oder Bindung von Molekülen bedingt ist.

Es sind verschiedene Versuche unternommen worden, die Empfindlichkeit evaneszent angeregter Lumineszenz zu steigern und integrierte optische Sensoren herzustellen. So wird zum Beispiel in Biosensors & Bioelectronics 6 (1991), 595-607 über planare mono- oder nieder-modale Wellenleiter berichtet, die in einem zweistufigen Ionenaustauschverfahren hergestellt werden, und bei denen die Einkopplung der Anregungswelle mit Prismen erfolgt. Als Affinitätssystem wird humanes Immunglobulin G / fluoresceinmarkiertes Protein A verwendet, wobei der Antikörper auf dem Wellenleiter immobilisiert und das nachzuweisende fluoresceinmarkierte Protein A in Phosphatpuffer einem Film aus Polyvinylalkohol zugesetzt wird, mit dem die Messregion des Wellenleiters überzogen wird.

Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß nur geringe Brechzahlunterschiede zwischen wellenleitender Schicht und Substratschicht erreichbar sind, was eine verhältnismässig geringe Empfindlichkeit zur Folge hat.

Die Empfindlichkeit wird mit 20 nM an Protein A gebundenem Fluoresceinisothiocyanat angegeben. Um geringste Spuren bestimmen zu können, ist dies noch unbefriedigend und daher eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit notwendig. Darüberhinaus erscheint die Reproduzierbarkeit und praktische Durchführbarkeit der Einkopplung der Anregungswelle durch Prismen aufgrund der grossen Abhängigkeit der Einkoppleffizienz von Qualität und Grösse der Kontaktfläche zwischen Prisma und Wellenleiter schwierig.

Die Verwendung von Gittern für die Lumineszenzdetektion welche den Oberbegriff unseres Anspruchs bilden, ist in der US-A-5 081 012 beschrieben. Es werden Gitterstrukturen zur Einkopplung der Anregungsstrahlung in einen Wellenleiter, sowie spezielle Reflexionsgitter, die ein mehrfaches Durchlaufen der Anregungswelle durch den Wellenleiter ermöglichen, offenbart. Auf diese Weise soll eine erhöhte Empfindlichkeit erreicht werden. Nachgewiesen wird die in den Raumwinkel abgestrahlte Volumenlumineszenz. Darüberhinaus kann die nach zweifachem Durchlauf vom Einkoppelgitter wieder ausgekoppelte Anregungsstrahlung als Referenzsignal verwendet werden. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die starke Erhöhung der Untergrundstrahlungsintensität durch das Reflexionsgitter, die mit dem Lumineszenzsignal in den Raumwinkel abgestrahlt wird. Damit begrenzen die Charakteristiken der notwendigen Filter wiederum die Nachweisempfindlichkeit.

Aufgabe der Erfindung ist, ein Verfahren zur Bestimmung einer Lumineszenz mit einem planaren optischen Wellenleiter bereitzustellen, das einfach und wirtschaftlich durchführbar ist, und für das insbesondere nur kleine Probenvolumina erforderlich sind. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung einer miniaturisierbaren Sensorplattform auf der Basis eines planaren optischen Wellenleiters für die Durchführung des Verfahrens.

Diese Aufgabe wird gelöst mit einem Verfahren zur Bestimmung einer Lumineszenz mit einer planaren, dielektrischen optischen Sensorplattform, die aus einem transparenten Substrat (a) besteht, auf das eine dünne, transparente wellenleitende Schicht (b) aufgebracht ist, wobei die Sensorplattform mit einem Koppelgitter zur Einkopplung der Anregungsstrahlung versehen ist und die Brechzahl des Substrats (a) kleiner ist als die Brechzahl der wellenleitenden Schicht (b), bei dem eine flüssige Probe als Superstrat mit der Schicht (b) in Kontakt gebracht wird, und die von lumineszenzfähigen Stoffen in der Probe oder von auf der Schicht (b) immobilisierten lumineszenzfähigen Stoffen erzeugte

Lumineszenz optoelektronisch gemessen wird, wobei man die Anregungsstrahlung mit dem Koppelgitter in den planaren Wellenleiter einkoppelt und die wellenleitende Schicht durchlaufen läßt, wodurch die lumineszenzfähigen Stoffe im evaneszenten Feld der wellenleitenden Schicht zur Lumineszenz angeregt werden, wobei man eine wellenleitende Schicht verwendet, deren Dicke kleiner ist als die Wellenlänge λ der Anregungsstrahlung und die aus einem Material besteht, dessen Brechzahl bei der Wellenlänge der Anregungsstrahlung $\geq 1,8$ ist, und wobei man die in die wellenleitende Schicht (b) zurückgekoppelte Lumineszenzstrahlung mit einem von dem ersten Koppelgitter räumlich getrennten zweiten Koppelgitter aus der wellenleitenden Schicht wieder auskoppelt und nachweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationstiefe der Gitter 3 bis 60 nm beträgt.

Bevorzugte Verwendungen des Verfahrens sind Gegenstand der Ansprüche 19 bis 22. Eine Sensorplattform und deren bevorzugte Ausführungsformen, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignet ist, beschreiben die Ansprüche 23 bis 36. Bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens sind Gegenstände der Ansprüche 2 bis 18.

Gemäß der Erfindung wird die Anregungsstrahlung mittels eines Koppelgitters in den Wellenleiter eingekoppelt und breitet sich in der wellenleitenden Schicht als geführte Welle aus. Für die effiziente evaneszente Anregung der Lumineszenz kann über die Wahl der Wellenleiter-Parameter (Brechzahl, Schichtdicke) eine hohe Feldstärke an oder nahe der Sensoroberfläche erzielt werden.

Überraschend hat sich gezeigt, daß für die nachfolgend beschriebene Dimensionierung des Wellenleiters ein wesentlicher Anteil der Lumineszenzstrahlung evaneszent in den Wellenleiter zurückgekoppelt wird und vom Wellenleiter zusammen mit der Anregungswelle transportiert wird. Somit kann die Lumineszenzstrahlung über ein zweites, vom ersten räumlich separiertes Koppelgitter aus dem Wellenleiter ausgekoppelt und dem Detektionssystem zugeführt werden. Der Vorteil dieser sog. „Gitterdetektion evaneszenter Lumineszenz“ gegenüber der „Volumendetektion“ nach dem Stand der Technik besteht in der vereinfachten Miniaturisierbarkeit der Sensorplattform und des zugehörigen Detektionssystems.

Die Dimensionierung planarer Wellenleiter für eine möglichst effiziente Lumineszenzanregung ist auf der Basis der Theorie planarer Wellenleiter möglich. Folgende Größen sind dazu heranzuziehen (W. Lukosz, „Principles and sensitivities of integrated optical and surface

plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing", Biosensors & Bioelectronics 6, 215-255 (1991), D.G. Hall, „Optical waveguide diffraction gratings: coupling between guided modes“, in Progress in Optics XXIX, Ed. E. Wolf, Elsevier, New York (1991)):

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes eines planaren Wellenleiters in das Superstrat ist gegeben durch

$$\Delta z_{\text{evo}} = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{N_{\text{eff}}^2 - n_{\text{super}}^2}}$$

für die effektive Modenbrechzahl N_{eff} , die Superstratbrechzahl n_{super} und für die Arbeitswellenlänge λ . Dabei bezeichnet z die Koordinate senkrecht zur Wellenleiter-Oberfläche, x ist die Koordinate der Wellenleiter-Ausbreitung. Unter Berücksichtigung des Normierungsfaktors f für die Feldstärke an der Wellenleiter-Oberfläche

$$f = \frac{n_{\text{film}}^2 - N_{\text{eff}}^2}{n_{\text{film}}^2 - n_{\text{sub}}^2},$$

mit Brechzahl des Wellenleiters n_{film} und des Substrates n_{sub} , ergibt sich ein Intensitätsverlauf I_E des evaneszenten Feldes oberhalb des Wellenleiters proportional zu:

$$I_E \sim f \cdot e^{-2z/\Delta z_{\text{evo}}}.$$

Dieser Intensitätsverlauf der anregenden evaneszenten Felder senkrecht zur Wellenleiter-Oberfläche gibt die wesentliche Skalierungsgröße für die Dimensionierung der Wellenleiterschichtdicke und -brechzahl vor. Für analytische Anwendungen zum Nachweis lumineszierender Moleküle nahe der Wellenleiterschicht ist bei der Wellenleiterdimensionierung der Abstand des Moleküls von der Wellenleiteroberfläche zu berücksichtigen.

Für die Lumineszenzdetektion wurde nun gefunden, daß für dünne, hochbrechende planare Wellenleiter die evaneszente Wiedereinkopplung der Lumineszenz ein effizientes Verfahren ist. Dabei wirkt sich die Wahl von Wellenleiterschichtdicke und -brechzahl sowohl auf die (berechenbare) Anregungseffizienz als auch auf die evaneszente Wiedereinkopplung aus. Bei Letzterer konkurrieren die Einkopplung der Strahlungsanteile von gebundenen

Molekülen nahe der Wellenleiter-Oberfläche und die Einkopplung von ungebundenen Molekülen aus dem Probenvolumen.

Für einen effizienten Nachweis lumineszenzfähiger Moleküle nahe der Wellenleiteroberfläche nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde gefunden, daß die Wellenleiter-Parameter in folgendem Bereich liegen müssen:

- Brechzahl $n_{\text{film}} \geq 1.8$ bei der Anregungswellenlänge λ ,
- Schichtdicke $t_{\text{film}} \leq \text{Anregungswellenlänge } \lambda$, bevorzugt $t_{\text{film}} \leq \lambda/2$.

Besonders bevorzugt beträgt die Dicke der wellenleitenden Schicht 40 bis 160 nm.

Die Modulationstiefe der Gitter beträgt gleichzeitig 3 bis 60 nm, wobei das Verhältnis Modulationstiefe/Schichtdicke $< 0,5$ ist.

Diese Wellenleiter können auch dadurch charakterisiert werden, daß sie typischerweise nur die Ausbreitung von Wellenleiter-Moden mit niedriger Ordnung $m \leq 3$ zulassen.

Die evaneszent in den Wellenleiter wiedereingekoppelte Lumineszenz wird in diesem transportiert, kennzeichnend dafür ist die Dämpfungskonstante Γ der geführten Welle. Hier kann bei geringer Stokes Verschiebung von gleichen Dämpfungswerten für die Anregungs- und Lumineszenzstrahlung ausgegangen werden (mögliche Ursachen der Wellenleiterdämpfung sind Streuverluste an den Grenzflächen des Wellenleiters sowie Absorption in der Wellenleiterschicht bzw. im Substrat oder Superstrat. Sowohl für Streuung als auch für Absorption ist keine signifikante Änderung der Dämpfung durch den Stokes - Shift von typisch 10 - 50 nm zu erwarten, wenn keine ausgeprägten schmalen Absorptionsbanden vorliegen. Solche spektral schmalbandigen Absorptionseffekte sind bei der Materialauswahl für die Sensorplattform zu vermeiden).

Diese im Wellenleiter transportierte Lumineszenz-Strahlung ist nun auszukoppeln und dem Detektionssystem zuzuführen. Eine Stimmflächen-Auskopplung ist nicht zweckmäßig: einerseits erfordert sie eine hohe Qualität der Wellenleiter-Kanten und ggf. die Kontaktierung der

Detektionsoptik über eine Flüssig- oder Gelimmersion, andererseits wird dadurch die Integration der Sensorelemente zusammen mit der Flüssigkeitszelle behindert.

Bei Verwendung eines zweiten, vom Koppelgitter für die Einkopplung der Anregungsstrahlung räumlich getrennten zweiten Koppelgitters zur Auskopplung der Lumineszenzstrahlung kann das Stimflächenproblem vollständig vermieden werden. Weiterhin ergibt sich der Vorteil, daß der Gitterabstand A in x -Richtung (d.h. in Richtung der geführten Welle) frei wählbar ist. Damit ist die Möglichkeit gegeben, den Abstand A jeweils optimal an die Dämpfungsverhältnisse für die jeweilige Wellenlänge anzupassen, ohne daß es erforderlich ist, die Außenabmessungen von Sensor und Flüssigkeitszelle zu verändern. Darüberhinaus ist es vorteilhaft, daß die Außenkanten des Sensorelementes keinen optischen Qualitätsanforderungen genügen müssen, so daß ihre Ausführungsform an die Fluidzelle - speziell an die Ausführungsform der verwendeten Dichtung - angepaßt werden kann.

Als optimaler Wert für den Gitterabstand B hat sich $B=x_{1/e}$ erwiesen, mit einer Variationsmöglichkeit im Bereich $B = (0.2 - 3) \cdot x_{1/e}$ ($x_{1/e}$: $1/e$ -Länge für den Intensitätsabfall der geführten Anregungswelle in x -Richtung).

(Umrechnung Γ [dB/cm] $\rightarrow x_{1/e}$ [1/mm]: $x_{1/e}=100/(\ln 10 \cdot \Gamma)$).

Für größere Abstände werden sowohl Anregungslicht als auch geführtes Lumineszenzlicht stark gedämpft und führen zu einer starken Signalreduzierung. Die Begrenzung nach unten ist nicht primär durch Anregung und Wiedereinkopplung gegeben, als vielmehr durch die damit verbundenen Anforderungen an die Positionierung der beiden Gitter und des Anregungsstrahls auf dem Einkoppelgitter. Hier sind Abstände unter $100\mu\text{m}$ unzweckmäßig, auch im Hinblick auf die unten beschriebene Dimensionierung von Breite des Einkoppelgitters und Strahldurchmesser der Anregungsstrahlung auf der Kante des Einkoppelgitters.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der Figuren näher erläutert:

Es zeigen:

Figur 1: in einer schematischen Darstellung in Seitenansicht eine optische Sensorplattform, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignet ist mit einem möglichen Strahverlauf;

Figur 2: in Draufsicht die Sensorplattform aus Figur 1.

In Fig. 1 ist die Sensorplattform mit 1 bezeichnet, das Koppelgitter für die Einkopplung der Anregungsstrahlung mit dem Bezugszeichen 2, das für die Auskopplung der Lumineszenzstrahlung mit dem Bezugszeichen 3. 4 ist die wellenleitende Schicht, 5 bezeichnet das Substrat (Trägermaterial).

Man erkennt in Fig. 1 einen möglichen Strahlengang bei der Ein- und Auskopplung von Anregungs- und Lumineszenzstrahlung in die bzw. aus der Sensorplattform. Durch das Koppelgitter 2 in der Sensorebene wird eine geführte Welle mit Ausbreitung in x-Richtung angeregt, wenn die Resonanzbedingung für die x-Komponenten der Wellenvektoren erfüllt ist:

$$k_{xz} = k_{\text{ein}} \pm m \cdot k_G = k_{\text{ein}} \pm m \cdot \frac{2\pi}{\Lambda_G}, \quad m: \text{ganze Zahl, } k_G: \text{reziproker Gittervektor}$$

$$k_{xz} = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot N_{\text{eff}} = k_0 \cdot N_{\text{eff}} : \text{Wellenvektor geführte Welle mit}$$

effektiver Modenbrechzahl N_{eff} .

In Fig. 1 ist für die Einkopplung mit

$$k_{\text{ein}} = k_0 \cdot \cos \vartheta \quad (k_0: \text{Betrag Wellenvektor in Zeichnungsebene})$$

ein negativer Winkel ϑ gezeigt, so daß die geführte Welle „in Gegenrichtung“ zur Anregung läuft (sog. „backward coupling“). Für die Auskopplung der Anregungswelle (mit k_{aus}) und der Lumineszenzstrahlung (mit k'_{aus}) sind positive Winkel gewählt.

Durch eine solche Ein- und Auskoppelkonfiguration mit deutlich verschiedenen Richtungen für reflektiertes einfallendes Licht und ausgekoppeltes Licht wird ein hohes Maß an Untergrundfreiheit erzielt. Die räumliche Trennung der verschiedenen Strahlungsanteile sichert ein optimales Verhältnis von Nutz- zu Störsignal bei der Lumineszenzdetektion: ausgekoppelte Anregungs- und Lumineszenzstrahlung laufen nicht in einem gemeinsamen Strahlengang, so daß Filter (in der Fig. 1 nicht gezeigt, Kanten- oder Bandpaßfilter) nur zur Unterdrückung von Streulicht, nicht aber der vollen Intensität der ausgekoppelten Anregungsstrahlung dienen.

Ein weiterer Vorteil bei Verwendung eines Auskoppelgitters besteht darin, daß verschiedene spektrale Komponenten der Lumineszenzstrahlung in unterschiedliche Richtungen ausgekoppelt werden. Dadurch können mit diesem Verfahren auch Moleküle in schwach lumineszierenden Probenmedien sogar ohne zusätzliche Filter nachgewiesen werden, wenn die

Lumineszenz von nachzuweisenden Molekülen und des Probenmediums spektral verschieden ist.

Die Einstellung der Winkel für Ein- und Auskopplung ist über die Wahl der Gitterkonstanten Λ_1 und Λ_2 möglich. Für den in Fig. 1 gezeigten, bevorzugten Fall mit einer Richtungsseparation zwischen Ein- und Auskopplung müssen die Gitterkonstanten deutlich unterschiedlich gewählt werden.

Alternativ können zur Vereinfachung der Herstellung des Sensors gleiche Gitterkonstanten für die Gitter 2 und 3 verwendet werden. Dies kann für eine möglichst kostengünstige Sensorherstellung wichtig sein, da bei Verwendung holografischer Strukturierung zur Gitterherstellung mehrere Prozeßschritte entfallen. Bei Verwendung gleicher Gitterkonstanten ist die räumliche Richtungstrennung von ausgekoppelter Anregungs- und Lumineszenzstrahlung immer noch gegeben. Nur die sichere Richtungsseparation der reflektierten Einkopplungsstrahlung entfällt, sodaß zusätzliche Maßnahmen zur Reflex-Abblendung notwendig sind, wie z.B. das Einbringen von Blenden oder Lichtfallen.

Die Koppelwinkel können durch die Wahl der Gitterkonstanten vorteilhaft in den Bereich von $|\vartheta| = 1^\circ$ bis 50° (für den Betrag des Winkels) gelegt werden. Kleinere Werte sollten wegen der Bragg-Reflexion vermieden werden, da sonst schon bei geringen Toleranzen der Justierung oder der Ebenheit des Sensors diese Reflexion eintritt, verbunden mit dem Ausbleiben der Ein- oder Auskopplung. Größere Winkel bis nahe 90° sind zwar möglich, für eine zweckmäßige Realisierung des Strahlengangs sollten jedoch Winkel weit außerhalb der Sensornormalen vermieden werden.

Die Dimensionierung der Gittertiefe kann nach dem Stand der Technik erfolgen (T. Tamir, S.T. Peng, "Analysis and Design of Grating Couplers", Appl. Phys. 14,235-254 (1979); T. Tamir, "Beam and waveguide couplers", in "Integrated Optics", Ed. T. Tamir, Springer, Berlin (1979)). Als Merkmal wird hier der sog. "Leckparameter" α herangezogen: α beschreibt den $1/e$ -Abfall der Intensität einer geführten Welle in einem Wellenleiter, dessen Grenzfläche mit einem Koppelgitter der Tiefe t_{Gitter} versehen ist. Somit ist $1/\alpha$ die charakteristische Länge für die Übertragung der Strahlungsenergie aus der geführten in eine sich frei ausbreitende Welle bzw. umgekehrt.

Wichtig für die Wahl der Tiefe des Einkoppelgitters ist nicht primär der absolute Wert des Leckparameters, sondern die Anpassung von Leckparameter und der Strahlparameter des auftreffenden Lichts (Strahldurchmesser und Divergenz). Zur optimalen Einkopplung eines

Laserstrahls mit gaußförmigem Strahlprofil (Gaußparameter w_0) über ein räumlich begrenztes Gitter müssen folgende Bedingungen für Leckparameter, Strahldurchmesser und Positionierung des Strahls bzgl. der Gitterkante berücksichtigt werden:

- $\alpha \cdot w_0 = 1.36$,
- $x_0/w_0 = 0.733$.

Die Größe x_0 beschreibt die Verschiebung der Mitte des Lichtflecks gegen die Position der Gitterkante, diese Verschiebung hat von der Kante weg auf den strukturierten Bereich zu erfolgen.

Bei Einhaltung dieser Bedingung können Einkoppleffizienzen von bis zu mehr als 80% erreicht werden.

Eine analoge Überlegung für die Auskopplung führt zu dem Ergebnis, daß auch hier eine hohe Koppleffizienz von 80% und mehr erreicht werden kann. Voraussetzung ist, daß die laterale Ausdehnung des Gitters in x-Richtung deutlich größer ist als der Leckparameter. Das Intensitätsprofil des ausgekoppelten frei propagierenden Lichtstrahls ist jedoch i.a. asymmetrisch, wegen der Dämpfung der geführten Welle durch das Gitter.

Bei der Festlegung des Leckparameters für die Einkopplung sind die Aspekte

- Positionierung des Strahlflecks bzgl. der Gitterkante und
 - Miniaturisierung des Sensorelementes
- zu berücksichtigen.

Kleine Leckparameter ($\alpha \ll 1/\text{mm}$) und entsprechend große Strahldurchmesser ($w_0 \gg 1\text{mm}$) vereinfachen zwar die Positionierung, allerdings wird bei Gitterbreiten A deutlich über $A=3\text{mm}$ die Miniaturisierbarkeit des Sensors deutlich eingeschränkt. Für eine vollständige Kopplung sollte die Gitterbreite $A > 3 \cdot w_0$ sein. Hier haben zudem Inhomogenitäten des Gitters und des Wellenleiters negativen Einfluß auf die Koppleffizienz.

Große Leckparameter ($\alpha > 10/\text{mm}$) mit Strahldurchmessern $w_0 < 10\text{ }\mu\text{m}$ erlauben zwar sehr kleine Gitterdimensionen, allerdings auch eine Positionierungs-Genauigkeit $\ll 100\text{ }\mu\text{m}$. Weiterhin wird die Koppleffizienz in diesem Fall dadurch begrenzt, daß die Strahldivergenz i.a. deutlich über dem Winkelbereich der Koppelresonanz liegt.

Wir haben gefunden, daß der Bereich von Leckparametern $\alpha = (0.2 - 5)/\text{mm}$ einen guten Kompromiß zwischen Justierungs-Anforderungen, Positionierungs-Toleranzen und Miniaturisierung darstellt. Diesem Bereich entspricht typischerweise für die oben beschriebenen Wellenleiter-Schichtdicken ein Bereich von $t_{\text{Gitter}} = 3 - 60\text{nm}$, besonders von $3 - 40\text{nm}$ für die Gittertiefe bei Verwendung einer sinusförmigen Modulation an der Grenzfläche Substrat-Wellenleiter. Da der Leckparameter stark von der Profilform des Gitters abhängt, ist nicht die geometrische Tiefe, sondern der Leckparameter die wichtige Größe für die Sensorfunktion.

Das Substrat der Sensorplattform muß bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge transparent sein. Als Substrat können auch Kunststoffe verwendet werden, wie sie zum Beispiel in der EP-A-0 533 074 beschrieben sind.

Das Substrat kann beispielsweise auch aus einem Verbundsystem aus verschiedenen Materialien, z.B. Schichtsystem auf Trägerplatte oder dgl., bestehen. In diesem Fall muß lediglich die Brechzahl des direkt an die wellenleitende Schicht angrenzenden Materials kleiner sein als die Brechzahl der wellenleitenden Schicht.

Eine kostengünstige Herstellung der Sensorplattform ist besonders dann möglich, wenn mikrostrukturierte Polymere als Substrat für die Wellenleiterbeschichtung verwendet werden können. In diesem Fall kann die Nachweisempfindlichkeit durch die Anregung der Substrat-Eigenlumineszenz begrenzt werden. Anregung dieser Eigenlumineszenz und evaneszente Wiedereinkopplung erfolgen an der Grenzfläche Wellenleiter-Substrat in ähnlicher Weise wie die oben beschriebenen Mechanismen an der Grenzfläche Wellenleiter/Superstrat. Diese Substrat-Lumineszenz kann durch eine niedrigbrechende (d. h. mit einer Brechzahl, die kleiner ist oder gleich der des Wellenleiters), nicht lumineszierende Zwischenschicht vermieden werden, die vor der Wellenleiter-Beschichtung auf das Substrat aufgebracht wird. Als Zwischenschicht-Material eignet sich besonders SiO_2 oder eine im wesentlichen aus SiO_2 bestehende Schicht der Zusammensetzung $\text{SiO}_x\text{H}_y\text{C}_z$, in die noch geringe Reste von Kohlenwasserstoffen eingebaut sind. Die Dicke t_{buffer} dieser

Zwischenschicht ist so zu wählen, daß die vom evaneszenten Feld der geführten Welle auf der Trägermaterialseite transportierte Energie innerhalb der Zwischenschicht lokalisiert ist. Diese Bedingung ist in der Praxis erfüllt, wenn t_{buffer} über dem sechsfachen Wert der Eindringtiefe z_{ev} des evaneszenten Feldes liegt. Für ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis bei der evaneszenten Lumineszenzdetektion kann ein fünffacher Wert sinnvoll sein. Diese Bedingung ist sicher erfüllt für $t_{\text{buffer}} \leq 2000 \text{ nm}$.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung einer Zwischenschicht kann auch eine Verminderung der Oberflächenrauigkeit des Substrats sein. Dadurch wird die Wellenleiterdämpfung Γ reduziert, mit positiven Auswirkungen auf das Signal - Rausch - Verhältnis bei der evaneszenten Lumineszenzdetektion.

Zur Lumineszenzanregung kommt nur weitgehend paralleles Licht in Frage. Unter weitgehend parallel ist im Rahmen dieser Erfindung eine Divergenz von weniger als 5° zu verstehen. Das heisst, das Licht kann schwach divergent oder schwach konvergent sein. Größere Divergenzen erleichtern zwar die Justierung der Einkoppelwinkel, reduzieren aber die Lumineszenzsignale, da die Breite der Einkoppelresonanz dann deutlich geringer ist als der Divergenzwinkel und somit nur ein kleiner Anteil der auftreffenden Energie für die Lumineszenzanregung zur Verfügung steht.

Planare, dielektrische optische Sensorplattform bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, dass sie in Form eines Streifens, einer Platte, einer runden Scheibe oder einer beliebigen anderen geometrischen Form ausgebildet sein kann, sofern diese mit bloßem Auge als planar angesehen wird. Abweichungen von der Planarität sind unkritisch, falls in der wellenleitenden Schicht eine geführte Welle ausbreitungsfähig ist und ein Ein- und Auskoppelschema analog zu dem in Fig. 1 realisiert werden kann. Die gewählte geometrische Form kann sich nach dem Aufbau des gesamten Gerätes richten, in das die Sensorplattform eingesetzt ist. Bevorzugt sind Anordnungen, die eine weitgehende Miniaturisierung zulassen.

Neben der oben beschriebenen Verwendung organischer, mikrostrukturierter Substrate können auch anorganische Substrate wie Gläser oder Quarz verwendet werden. Diese haben gegenüber Polymeren den Vorteil einer geringen Eigenlumineszenz. Zur kostengünstigen Herstellung der Sensorplattformen ist es jedoch zweckmäßig, diese Substrate mit einer niedrigbrechenden Beschichtung zu versehen, in die die Gitterstruktur für die Koppelgitter wie in EP-A-0 533 074 beschrieben, eingebracht wird.

Weiterhin können die Koppelgitter auch an der Grenzfläche Wellenleiter/Superstrat angeordnet werden.

Verfahren zur Erzeugung solcher Gitter sind bekannt. Vorwiegend werden photolithographische oder holographische Verfahren und Ätztechniken für ihre Herstellung eingesetzt, wie sie beispielsweise in Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors V. Proc. SPIE, Vol 2068, 1-13, 1994 beschrieben sind.

Die Gitterstruktur kann auf dem Trägermaterial erzeugt und danach in die wellenleitende Schicht übertragen werden, in der sich dann die Gitterstruktur abbildet, oder das Gitter wird in der wellenleitenden Schicht selbst erzeugt.

Die Gitterperiode kann 200 bis 1000 nm betragen, wobei das Gitter vorteilhaft nur eine Periodizität aufweist, das heisst monodiffraktiv ist.

Unter Probe wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die gesamte zu untersuchende Lösung verstanden, die eine nachzuweisende Substanz - den Analyt - enthalten kann. Der Nachweis kann in einem ein-oder mehrstufigen Assay erfolgen, in dessen Verlauf die Oberfläche der Sensorplattform mit einer oder mehreren Lösungen kontaktiert wird. Dabei enthält mindestens eine der verwendeten Lösungen einen lumineszenzfähigen Stoff, der erfindungsgemäß detektiert werden kann.

Wenn ein lumineszenzfähiger Stoff bereits an der wellenleitenden Schicht (b) adsorbiert ist, kann die Probe auch frei von lumineszierenden Bestandteilen sein. Die Probe kann weitere Bestandteile enthalten, wie zum Beispiel pH-Puffer, Salze, Säuren, Basen, oberflächenaktive Stoffe, viskositätsbeeinflussende Zusätze oder Farbstoffe. Insbesondere kann eine physiologische Kochsalzlösung als Lösungsmittel verwendet werden. Wenn der lumineszenzfähige Teil selbst flüssig ist, so kann auf die Zugabe eines Lösungsmittels verzichtet werden. In diesem Fall kann die Probe bis zu 100% lumineszenzfähigen Anteil enthalten.

Weiterhin kann die Probe ein biologisches Medium, wie zum Beispiel Eigelb, eine Körperflüssigkeit oder deren Bestandteile, insbesondere Blut, Serum, Plasma oder Urin enthalten. Darüberhinaus kann es sich um Oberflächenwasser, Lösungen von Extrakten aus natürlichen oder synthetischen Medien wie Böden oder Pflanzenteilen, Bioprozessbrühen oder Synthesebrühen handeln.

Die Probe kann entweder unverdünnt oder zusätzlich mit einem Lösungsmittel verwendet werden.

Als Lösungsmittel kommen Wasser, wässrige Puffer- und Proteinlösungen sowie organische Lösungsmittel in Frage. Als organische Lösungsmittel eignen sich Alkohole, Ketone, Ester, und aliphatische Kohlenwasserstoffe. Bevorzugt werden Wasser, wässrige Puffer oder ein Gemisch von Wasser mit einem damit mischbaren organischen Lösungsmittel verwendet.

Die Probe kann aber auch im Lösungsmittel nicht lösliche Bestandteile enthalten, wie Pigmentteilchen, Dispergatoren, natürliche und synthetische Oligomere oder Polymere. Sie liegt dann als optisch trübe Dispersion oder Emulsion vor.

Als lumineszierende Verbindungen können Lumineszenzfarbstoffe mit einer Lumineszenz im Wellenlängenbereich von 330 nm bis 1000 nm, wie Rhodamine, Fluoresceinderivate, Cumarinderivate, Distyrylbiphenyle, Stilbenderivate, Phthalocyanine, Naphthalogencyanine, Polypyridyl- Rutheniumkomplexe, wie z. B. Tris(2,2'- bipyridyl)rutheniumchlorid, Tris(1,10-phenanthrolin)rutheniumchlorid, Tris(4,7-diphenyl-1,10- phenanthrolin)rutheniumchlorid und Polypyridyl-Phenazin- Rutheniumkomplexe, Platin-Porphyrin-Komplexe, wie z. B. Octaethyl-Platin-Porphyrin, langlebige Europium- und Terbiumkomplexe oder Cyanin-Farbstoffe verwendet werden. Besonders geeignet für Analysen in Blut oder Serum sind Farbstoffe mit Absorptions- und Emissionswellenlängen im Bereich 600 - 900 nm.

Ganz besonders geeignete lumineszierende Verbindungen sind Farbstoffe wie beispielsweise Fluoresceinderivate, die funktionelle Gruppen enthalten, mit denen sie kovalent gebunden werden können, wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat.

Ebenfalls gut geeignet sind die von der Fa. Biological Detection Systems Inc. im Handel befindlichen funktionellen Fluoreszenzfarbstoffe, beispielsweise die mono- und bifunktionellen Cy5.5™ Farbstoffe, die zum Beispiel auch in Clinical Chemistry 40 (9) : 1819-1822, 1994 beschrieben sind.

Bevorzugte Lumineszenz ist die Fluoreszenz. Für die Anregung verwendet man bevorzugt kohärentes Licht, da sich damit die Resonanzbedingung am Einkoppelgitter mit hoher Effizienz erfüllen läßt. Die dazu eingesetzten Laserlichtquellen sind nach den Absorptionswellenlängen der lumineszierenden oder fluoreszierenden Moleküle auszuwählen.

Eine besondere Bedeutung kommt dabei Laserdioden oder Superlumineszenzdioden zu, da solche Lichtquellen eine starke Miniaturisierung des der Sensorplattform zugeordneten Detektionssystems ermöglichen.

Die zur Anwendung kommenden Lumineszenzfarbstoffe können auch chemisch an Polymere oder an einen der Bindungspartner in biochemischen Affinitätssystemen, z. B. Antikörper oder Antikörperfragmente, Antigene, Proteine, Peptide, Rezeptoren oder ihre Liganden, Hormone oder Hormonrezeptoren, Oligonukleotide, DNA-Stränge und RNA-Stränge,

DNA- oder RNA- Analoga, Bindungsproteine wie Protein A und G, Avidin oder Biotin, Enzyme, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektine oder Kohlenhydrate, gebunden sein. Die zuletzt genannte kovalente Lumineszenzmarkierung ist für reversible oder irreversible (bio)chemische Affinitätsassays die bevorzugte Verwendung. Weiterhin können auch lumineszenzmarkierte Sterole, Lipide und Chelatoren zum Einsatz kommen. Speziell für Hybridisierungsassays mit DNA-Strängen oder Oligonukleotiden sind auch interkalierende Lumineszenzfarbstoffe besonders geeignet, insbesondere wenn sie - wie verschiedene Rutheniumkomplexe - bei der Interkalation eine Lumineszenzverstärkung aufweisen. Werden diese lumineszenzmarkierten Verbindungen mit ihren auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisierten Affinitätspartnern in Kontakt gebracht, so lässt sich ihre Bindung leicht anhand der gemessenen Lumineszenzintensität quantitativ bestimmen. Ebenso ist eine quantitative Bestimmung des Analyten durch Messung der Lumineszenzänderung bei Wechselwirkung der Probe mit den Luminophoren möglich, z. B. in Form von Lumineszenzlöschung durch Sauerstoff oder von Lumineszenzverstärkung durch Konformationsänderungen von Proteinen.

Für die Herstellung der wellenleitenden Schicht kommen zum Beispiel anorganische Materialien, insbesondere anorganische Metalloxide wie TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , oder ZrO_2 in Frage.

Bevorzugt sind Ta_2O_5 und TiO_2 .

Im erfindungsgemässen Verfahren kann die Probe sowohl stationär mit der wellenleitenden Schicht in Kontakt gebracht werden, als auch kontinuierlich über sie geleitet werden, wobei der Kreislauf offen oder geschlossen sein kann.

Eine spezifische Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass man die zum Nachweis des Analyten benutzten lumineszenzfähigen Stoffe direkt an der Oberfläche der wellenleitenden Schicht (b) immobilisiert. Es kann sich dabei zum Beispiel um einen an ein Protein gebundenen Luminophor handeln, der auf diese Weise an der Oberfläche der wellenleitenden Schicht zur Lumineszenz angeregt werden kann. Wird ein für das Protein affiner Partner über diese immobilisierte Schicht geleitet, so kann dadurch die Lumineszenz verändert und auf diese Weise die Menge des affinen Partners bestimmt werden. Insbesondere können auch beide Partner eines Affinitätskomplexes mit Luminophoren markiert sein, um Konzentrationsbestimmungen anhand des Energietransfers zwischen den beiden, etwa in Form von Lumineszenzlöschung, vornehmen zu können.

Eine andere, bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens für chemische oder biochemische Affinitätsassays besteht darin, daß man auf der Oberfläche der Sensorplattform einen spezifischen Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für den Analyten selbst oder für einen der Bindungspartner immobilisiert. Dabei kann es sich um einen ein- oder mehrstufigen Assay handeln, in dessen Verlauf in aufeinanderfolgenden Schritten eine oder mehrere Lösungen mit spezifischen Bindungspartnern für die auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisierten Erkennungselemente geführt werden, wobei der Analyt in einem der Teilschritte gebunden wird. Der Nachweis des Analyten erfolgt dabei durch Bindung von lumineszenzmarkierten Teilnehmern des Affinitätsassays.

Bei den dabei eingesetzten lumineszenzmarkierten Stoffen kann es sich um einen oder mehrere beliebige Bindungspartner des Affinitätsassays handeln, oder auch um einen mit einem Luminophoren versehenen Analog des Analyten. Voraussetzung ist lediglich, dass die Anwesenheit des Analyten selektiv zu einem Lumineszenzsignal oder selektiv zu einer Änderung des Lumineszenzsignals führt.

Die Immobilisierung der Erkennungselemente kann zum Beispiel durch hydrophobe Adsorption oder kovalente Bindung direkt auf der wellenleitenden Schicht oder nach chemischer Modifikation der Oberfläche, z. B. durch Silanisierung oder Aufbringung einer Polymerschicht, erfolgen. Zusätzlich kann zur Erleichterung der Immobilisierung der Erkennungselemente direkt auf dem Wellenleiter eine dünne Zwischenschicht als Haftvermittlungsschicht, z. B. bestehend aus SiO_2 , aufgebracht werden. Die Dicke dieser Zwischenschicht sollte 50 nm, vorzugsweise 20 nm, nicht übersteigen.

Als Erkennungselemente kommen zum Beispiel Antikörper für Antigene, Bindungsproteine wie Protein A und G für Immunglobuline, Rezeptoren für Liganden, Oligonukleotide und RNA- oder DNA-Einzelstränge für ihre Komplementärstränge, Avidin für Biotin, Enzyme für Enzymsubstrate, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektine für Kohlehydrate in Frage. Welcher der jeweiligen Affinitätspartner auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert wird, ist abhängig von der Architektur des Assays.

Der Assay selbst kann sowohl ein einstufiger Komplexierungsprozess, beispielsweise ein kompetitiver Assay, oder auch ein mehrstufiger Prozess, beispielsweise ein Sandwich-Assay, sein.

Im einfachsten Fall des kompetitiven Assays wird die Probe, welche den Analyten in unbekannter Konzentration sowie eine bekannte Menge einer bis auf eine Lumineszenzmarkierung gleichartigen Verbindung enthält, mit der Oberfläche der Sensorplattform in Kontakt gebracht, wo die lumineszenzmarkierten und unmarkierten Moleküle um die Bindungsstellen an ihren immobilisierten Erkennungselementen konkurrieren. Bei dieser Assaykonfiguration erhält man ein maximales Lumineszenzsignal, wenn die Probe keinen Analyten enthält. Mit steigender Konzentration der nachzuweisenden Substanz werden die zu beobachtenden Lumineszenzsignale niedriger.

In einem kompetitiven Immunoassay braucht nicht unbedingt der Antikörper, sondern es kann auch das Antigen auf der Oberfläche der Sensorplattform als Erkennungselement immobilisiert werden. Generell ist es beliebig, welcher der Partner in chemischen oder biochemischen Affinitätsassays immobilisiert wird. Dieses ist ein prinzipieller Vorteil von auf Lumineszenz basierenden Assays gegenüber Verfahren wie beispielsweise Oberflächenplasmonenresonanz oder Interferometrie, welche auf der Änderung adsorbierter Masse im evaneszenten Feld der wellenleitenden Schicht beruhen.

Weiterhin braucht im Falle kompetitiver Assays die Konkurrenz nicht beschränkt zu sein auf Bindungsstellen an der Oberfläche der Sensorplattform. Beispielsweise kann auch eine bekannte Menge eines Antigens an der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert werden, welches anschliessend mit der Probe in Kontakt gebracht wird, die eine unbekannte, nachzuweisende Menge des gleichen Antigens als Analyten sowie lumineszenzmarkierte Antikörper enthält. In diesem Fall findet die Konkurrenz zwischen an der Oberfläche immobilisierten und in Lösung befindlichen Antigenen um Bindung der Antikörper statt.

Der einfachste Fall eines mehrstufigen Assays ist ein Sandwich-Immunoassay, bei dem ein primärer Antikörper auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert wird. Die Bindung des nachzuweisenden Antigens und des zur Ausführung des Nachweises benutzten, lumineszenzmarkierten sekundären Antikörpers an ein zweites Epitop des Antigens kann sowohl durch aufeinanderfolgende Kontaktierung mit der das Antigen enthaltenden Lösung und einer zweiten, den lumineszenzmarkierten Antikörper enthaltenden Lösung erfolgen, als auch nach vorheriger Zusammenführung dieser beiden Lösungen, so dass abschliessend der Teilkomplex, bestehend aus Antigen und lumineszenzmarkiertem Antikörper, gebunden wird.

Affinitätsassays können auch weitere zusätzliche Bindungsschritte enthalten. Beispielsweise kann im Falle von Sandwich-Immunoassays in einem ersten Schritt Protein A auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert werden, welches spezifisch Immunglobuline an ihrem sogenannten F_c -Teil bindet, welche dann als primäre Antikörper in einem nachfolgenden Sandwichassay dienen, der wie beschrieben ausgeführt werden kann.

Es gibt eine Vielzahl weiterer Ausführungsformen von Affinitätsassays, beispielsweise unter Verwendung des bekannten Avidin- Biotin-Affinitätssystems.

Beispiele von Ausführungsformen von Affinitätsassays finden sich bei J. H. Rittenburg, Fundamentals of Immunoassay; in Development and Application of Immunoassay for Food Analysis, J. H. Rittenburg (Ed.), Elsevier, Essex 1990, oder in P. Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds), Elsevier, Amsterdam 1985.

Weiterhin ist es möglich, die Oberfläche der Sensorplattform sowohl nicht nur für den Einmalgebrauch zu benutzen, sondern auch sie zu regenerieren. Unter geeigneten Bedingungen, beispielsweise niedrigem pH, erhöhter Temperatur, unter Anwendung organischer Lösungsmittel oder bei Einsatz sogenannter chaotroper Reagenzien (Salze), können die Affinitätskomplexe selektiv dissoziiert werden, ohne die Bindungsfähigkeit der immobilisierten Erkennungselemente wesentlich zu beeinträchtigen. Die genauen Bedingungen sind stark abhängig vom jeweiligen Affinitätssystem.

Eine weitere wesentliche Anwendungsform des Verfahrens beruht zum einen auf der Beschränkung der Signalerzeugung - im Falle der Rückkopplung gilt dies auch für die Detektion - auf das evaneszente Feld des Wellenleiters, zum anderen auf die Reversibilität der Affinitätskomplexbildung als Gleichgewichtsprozess: Unter Anwendung geeigneter Flussraten in einem Durchflusssystem kann die Bindung oder Desorption bzw. Dissoziation gebundener, lumineszenzmarkierter Affinitätspartner im evaneszenten Feld in Echtzeit verfolgt werden. Daher eignet sich das Verfahren für kinetische Studien zur Bestimmung unterschiedlicher Assoziations- oder Dissoziationskonstanten oder auch für Verdrängungsassays.

Die Detektion der evaneszent angeregten Lumineszenz kann mit bekannten Methoden erfolgen. Geeignet sind Photodioden, Photozellen, Photomultiplier, CCD-Kameras und Detektor-Arrays, wie z. B. CCD-Zeilen. Die Lumineszenz kann mit optischen Elementen wie Spiegeln, Prismen, Linsen, Fresnellinsen und Gradientenindexlinsen auf diese abgebildet wer-

den. Zur Selektion der Emissionswellenlänge können bekannte Elemente wie Filter, Prismen, Monochromatoren, dichroitische Spiegel und Beugungsgitter verwendet werden.

Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht auch darin, dass neben der Lumineszenzdetektion auch die Absorption des eingestrahlten Anregungslichtes bestimmt werden kann. Gegenüber multimodalen Wellenleitern faseroptischer oder planarer Bauart wird in diesem Fall ein wesentlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht. Durch das gleichzeitige Messen von Lumineszenz und Absorption lassen sich mit hoher Empfindlichkeit Lumineszenzlöscheffekte feststellen.

Das Verfahren kann in einer einfachen Ausführung so durchgeführt werden, daß man das Anregungslicht im "continuous wave" (cw) Betrieb einstrahlt, dies bedeutet, daß mit zeitlich konstanter Lichtintensität angeregt wird.

Darüber hinaus kann mit einer Impulsanregung gearbeitet werden derart, daß man das Anregungslicht in Form eines zeitlichen Pulses mit einer Pulsdauer von zum Beispiel einer Pikosekunde bis zu 100 Sekunden einstrahlt und die Lumineszenz zeitlich aufgelöst - im Falle kurzer Pulsdauern - oder in Intervallen von Sekunden bis zu Minuten detektiert. Diese Methode ist besonders dann vorteilhaft, wenn man zum Beispiel die Geschwindigkeit einer Bindungsbildung analytisch verfolgen oder eine Lumineszenzsignalabnahme infolge photochemischen Ausbleichens verhindern will mittels kurzer Belichtungszeiten. Weiterhin ist bei Verwendung entsprechend kurzer Pulsdauer und geeigneter Zeitauflösung der Detektion die Unterscheidung von Streulicht, Ramanemission und kurzlebiger Lumineszenz möglicherweise vorhandener, unerwünschter lumineszierender Bestandteile der Probe und des Sensormaterials gegenüber einer in diesem Fall möglichst langlebigen Lumineszenz des Markierungsmoleküls möglich, indem die Emission des Analyten erst nach Abklingen dieser kurzlebigen Strahlung detektiert wird. Darüber hinaus erlaubt zeitaufgelöste Lumineszenzdetektion nach gepulster Anregung, ebenso wie modulierte Anregung und Detektion, die Untersuchung des Einflusses der Bindung des Analyten auf das molekulare Lumineszenzabklingverhalten. Die molekulare Lumineszenzabklingzeit kann, neben der spezifischen Analyterkennung durch die immobilisierten Erkennungselemente und der räumlichen Beschränkung der Signalerzeugung auf das evaneszente Feld des Wellenleiters, als ein weiteres Selektivitätskriterium benutzt werden.

Das Verfahren kann auch so durchgeführt werden, daß man, bei einer oder mehreren Frequenzen, das Anregungslicht intensitätsmoduliert einstrahlt und die resultierende Phasenverschiebung und Modulation der Probenlumineszenz detektiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Analyten in chemischen oder biochemischen Affinitätsassays mit bekannten Affinitätspartnern und Assayarchitekturen, mittels Detektion der Emission von lumineszenzfähig markierten Bindungspartnern oder mittels Detektion von Änderungen der Lumineszenzeigenschaften immobilisierter, lumineszenzmarkierter Affinitätspartner durch Wechselwirkung mit dem Analyten.

Da Signalerzeugung und -detektion auf die chemische oder biochemische Erkennungsoberfläche auf dem Wellenleiter beschränkt sind und Störsignale aus dem Medium diskriminiert werden, kann die Bindung von Substanzen an die immobilisierten Erkennungselemente in Echtzeit verfolgt werden. Die Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens zum Affinitätsscreening oder für Verdrängungsassays, insbesondere für die pharmazeutische Produktentwicklung, mittels direkter Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsraten in einem Durchflusssystem mit geeigneten Flussraten, ist daher ebenfalls möglich.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern oder Antigenen.

Die Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Rezeptoren oder Liganden, Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymsubstraten, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens zur selektiven quantitativen Bestimmung lumineszierender Bestandteile in optisch trüben Flüssigkeiten.

Optisch trübe Flüssigkeiten können zum Beispiel biologische Flüssigkeiten wie Eigelb oder Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma sein, aber auch Proben aus der Umweltanalytik wie beispielsweise Oberflächenwasser, gelöste Erdextrakte oder gelöste Pflanzenextrakte. In Frage kommen auch Reaktionslösungen, wie sie beispielsweise bei der chemischen Produktion anfallen, insbesondere Farbstofflösungen oder Reaktionslösungen

von fluoreszierenden Aufhellern. In Frage kommen auch alle Arten von Dispersionen und Zubereitungen, wie sie zum Beispiel in der Textilindustrie eingesetzt werden, sofern diese eine oder mehrere lumineszierende Komponenten enthalten. Das Verfahren kann somit ferner zur Qualitätssicherung verwendet werden.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.
Die Konzentrationsangabe M bedeutet mol pro Liter.

Ausführungsbeispiel:

Optisches System

Als Lichtquelle wird eine Laserdiode bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ (Oz-Optics) verwendet, mit Hilfe eines Abbildungssystems erfolgt die Einstellung auf einen Strahlfleck mit Durchmesser in der Sensorebene von 0,4 mm senkrecht zu den Linien des Koppelgitters und 2,5 mm parallel zu den Gitterlinien.

Die Einstellung der Einkoppelwinkel und die Positionierung des Strahlflecks bzgl. der Gitterkante wird über mechanische Verstelleinheiten durchgeführt.

Die Laserleistung auf dem Sensorchip kann im Bereich $P = 0 \dots 3 \text{ mW}$ gewählt werden, für die nachfolgend beschriebenen Experimente zur Charakterisierung der Gitter wurde $P = 1,2 \text{ mW}$ verwendet, für die Fluoreszenzmessungen $P = 0,2 \text{ mW}$. Durch drehbare polarisierende Elemente kann wahlweise linear polarisiertes Licht mit TE- oder TM-Orientierung eingekoppelt werden.

Auf der Oberseite der Sensorplattform ist eine Durchflußzelle angeordnet, die mit O-Ringen gegen den Sensor abgedichtet ist. Das Probenvolumen dieser Zelle beträgt ca. 8 μl . Mit Hilfe von Spritzenpumpen und Umschaltventilen können verschiedene Lösungen in die Zelle eingebracht werden.

Die Anregung und Detektion erfolgen wie in Fig. 1 schematisch dargestellt von der Unterseite der Sensorplattform.

Für die Detektion stehen 3 Meßkanäle zur Verfügung, für das am Auskoppelgitter ausgekoppelte Fluoreszenz- und Anregungslicht (in Richtung von k'_{aus} und k_{aus} gem. Fig.1), sowie über einen Strahlteiler für das einfallende Anregungslicht (In Fig. 1 nicht gezeigt).

Als Detektor für die Fluoreszenzstrahlung wird ein Multiplier im Single-Photon-Counting Mode (Hamamatsu R 4632 SEL) mit einer Impulsformungselektronik (Hamamatsu C3 866) verwendet. Dessen TTL-Ausgangssignal wird mit einem konventionellen Impulzzähler (Hewlett-Packard 53131A) gezählt. Über eine Fokussierungsoptik kann die Fluoreszenzstrahlung für die Winkelbereiche auf den Detektor fokussiert werden. Zur Streulichtunterdrückung sind vor dem Detektor Interferenzfilter (Bandpaß bei $\lambda = 725$ nm mit Halbwertsbreite 25 nm, Omega) angeordnet.

Als Referenzdetektoren für einfallende und ausgekoppelte Anregungsstrahlung kommen Si-Dioden (UDT PIN 10 D) mit einem nachgeschalteten Meßverstärker (UDU 101 C) zum Einsatz.

Alle 3 Meßkanäle können während der Durchführung des unten beschriebenen Essays mit einem konventionellen Datenerfassungssystem simultan ausgewertet werden.

Sensorplattform

Als Substrat wird Polycarbonat verwendet, das mit zwei Gittern für Ein- und Auskoppelung in folgender Art mikrostrukturiert ist:

Einkoppelgitter mit Periode $\Lambda_1 = (299.5 \pm 0.7$ nm), Tiefe $t_1 = 6.9$ nm bis 12.3 nm, Auskoppelgitter mit Periode $\Lambda_2 = (489.5 \pm 0.6$ nm), Tiefe $t_1 = 8.2$ nm bis 12.8 nm, beide Gitter mit näherungsweise \sin^4 -förmigem Profil.

Die Anordnung der Gitter auf dem Sensor erfolgt analog zu Fig. 2, mit folgenden geometrischen Größen: Gitterabstand $A = 4$ mm, Gitterbreite (senkrecht zu Linien) $B_1 = B_2 = 2$ mm, Gitterhöhe (parallel zu Linien) 4 mm, bei Abmessungen der Sensorplattform von 12×20 mm².

Auf diesem Substrat ist zur Unterdrückung der Polycarbonat-Eigenfluoreszenz eine SiO₂-Zwischenschicht mit einer Brechzahl $n = 1.46$ und einer Dicke von $t_{\text{buffer}} = (100 \pm 10)$ nm aufgebracht, nachfolgend die hochbrechende wellenleitende Schicht aus TiO₂ mit der Brechzahl $n_{\text{film}} = 2.35$ bei $\lambda = 670$ nm und der Schichtdicke $t_{\text{film}} = (170 \pm 5)$ nm.

Durch das Anregungslicht können für diese Gitter-Wellenleiter-Kombination die Moden mit Ordnung $m = 0$ im Wellenleiter angeregt werden: für TE_0 erfolgt die Einkopplung unter einem Winkel von $\theta = (-10 \pm 1.6)^\circ$, alternativ für TM_0 unter dem Winkel $\theta = (-22.7 \pm 3.7)^\circ$.

Die Fluoreszenzstrahlung wird mit TE-Polarisation in einem Winkelbereich von $\theta = 31^\circ \dots 40^\circ$ ausgekoppelt, das Anregungslicht bei Winkeln $\theta > 42^\circ$. Diesem Winkelbereich der Fluoreszenzstrahlung entspricht ein Spektralbereich von λ ca. 685 nm ... 715 nm. Für TM-Polarisation liegen die Auskoppelwinkel bei $\theta = 17^\circ \dots 25^\circ$ für die Fluoreszenz und $\theta > 27^\circ$ für die Anregungsstrahlung. Für TE-Polarisation werden für eine einfallende Laserleistung von $P = 1.2$ mW nach dem Auskoppelgitter $P = 30 \dots 50$ μ W Lichtleistung nachgewiesen.

Detektion von Cy 5.5™ - markiertem Immunoglobulin

Markierung von Immunoglobulin mit Cy 5.5™ -Farbstoff:

Kaninchen-Immunoglobulin (rabbit-IgG, Sigma Chemicals) wurde in ähnlicher Weise, wie vom Farbstoffhersteller beschrieben, mit bifunktionellem Cyaninfarbstoff FluoroLink™ Cy 5.5™ (Biological Detection Systems, Pittsburgh, PA 15238, USA) markiert:

1. Lösung von 2.5 mg rabbit-IgG in 1 ml Natriumcarbonatpuffer (0.1 M, pH 9.3)
2. Zugabe dieser Lösung zu 1 ml Farbstoff, Inkubation für 45 min, alle 10 min Schütteln der Lösung.
3. Trennung von proteingebundenem und ungebundenem Farbstoff über eine Sephadex® G25-Säule (Pharmacia LKB, Biotechnology AB, Uppsala, Schweden), welche zuvor mit 50 ml Phosphatpuffer bei pH 7 equilibriert wurde:
 - Verwerfen des 1. ml
 - Auffangen mehrerer Fraktionen
4. Bestimmung des Farbstoff/Protein-Verhältnisses aus den optischen Dichten bei 678 nm (Absorptionsbande des Farbstoffs) und bei 280 nm (Protein-Absorptionsbande). Hieraus wurde ein Verhältnis von 1 Farbstoff- zu 2 Proteinmolekülen bestimmt.

Verwendete Lösung:

- 1) Pufferlösung, bestehend aus Phosphatpuffer (0.041 M Na_2HPO_4 + 0.028 M KH_2PO_4), 0,151 M NaCl, 200 mg/l Natriumazid, 50 ml Methanol, aufgefüllt auf 1 l mit destilliertem Wasser;
- 2) Lösung zur Immobilisierung von Protein A (Sigma Chemicals): 1 mg Protein A in 1 ml destilliertem Wasser;
- 3) Absättigungslösung: Pufferlösung 1) + 10 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA, Sigma Chemicals);
- 4) Spüllösung, wird auch verwendet zur Bestimmung des Signaluntergrunds, Pufferlösung 1) + 1 mg/ml BSA;
- 5) Probenlösungen Cy 5.5™ - markiertes Immunglobulin in verschiedenen Konzentrationen 10^{-8} M; 10^{-9} M; $3 \cdot 10^{-10}$ M, $1 \cdot 10^{-10}$ M in Pufferlösung 1) mit 1 mg/ml BSA;
- 6) Regenerierungslösung: Glycinpuffer, pH 2,5;

Aufbringen der biochemischen Erkennungsschicht aus Protein A

Die optische Sensorplattform wird 10 Stunden lang mit der Lösung 2) zur Immobilisierung von Protein A inkubiert. Um eventuell noch freie Adsorptionsstellen abzusättigen, wird die Sensorplattform nach Waschen mit destilliertem Wasser nochmals eine Stunde in der Absättigungslösung mit 10 mg/ml BSA inkubiert.

Meßverfahren/Versuchdurchführung:

Während des gesamten Verfahrens wird ein Fluß von 0,25 ml/min über die aktive Sensorfläche geführt.

Das Verfahren besteht aus folgenden Einzelschritten:

- 4 Minuten Waschen mit Spüllösung 4), Aufnahme des Untergrund-Signals.
- 4 Minuten Zufuhr der Probenlösung 5)

- 4 Minuten Waschen mit Spüllösung 4)
- 4 Minuten Zufuhr der Regenerierungslösung 6)
- 4 Minuten Waschen mit Spüllösung 4).

Das über das 2. Gitter ausgekoppelte Fluoreszenzsignal wird während des gesamten Verfahrens gemessen. Bei den verschiedenen Konzentrationen ergeben sich folgende Signaländerungen am Ende der Probenzufuhr, verglichen mit dem anfänglichen Background-Signal (Signal-Rauschverhältnis zwischen 50 und 100 Impulsen pro Sekunde (cps)):

[Cy5.5-IgG] Fluoreszenzsignal [cps]

10^{-8} M 7.000

10^{-9} M 850

$3 \cdot 10^{-10}$ M 300

Die Nachweisgrenze für die Detektion per Gitterauskopplung der Fluoreszenz liegt deutlich unter $3 \cdot 10^{-10}$ M, entsprechend einer Analytmenge von $3 \cdot 10^{-13}$ mol Cy5.5- markiertem IgG.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Lumineszenz mit einer planaren, dielektrischen optischen Sensorplattform, die aus einem transparenten Substrat (a) besteht, auf das eine dünne, transparente wellenleitende Schicht (b) aufgebracht ist, wobei die Sensorplattform mit einem Koppelgitter zur Einkopplung des Anregungslichts versehen ist und die Brechzahl des Substrats (a) kleiner ist als die Brechzahl der wellenleitenden Schicht (b), bei dem eine flüssige Probe als Superstrat mit der Schicht (b) in Kontakt gebracht wird, und die von lumineszenzfähigen Stoffen in der Probe oder von auf der Schicht (b) immobilisierten lumineszenzfähigen Stoffen erzeugte Lumineszenz optoelektronisch gemessen wird, wobei man die Anregungsstrahlung mit dem Koppelgitter in den Wellenleiter einkoppelt und die wellenleitende Schicht (b) durchlaufen läßt, wodurch die lumineszenzfähigen Stoffe im evaneszenten Feld der wellenleitenden Schicht zur Lumineszenz angeregt werden,

wobei eine wellenleitende Schicht verwendet wird, deren Dicke kleiner ist, als die Wellenlänge λ der Anregungsstrahlung und die aus einem Material besteht, dessen Brechzahl bei der Wellenlänge des Anregungslichts $\geq 1,8$ ist, und daß man diese in die wellenleitende Schicht (b) zurückgekoppelte Lumineszenzstrahlung mit einem von dem ersten Koppelgitter räumlich getrennten zweiten Koppelgitter aus der wellenleitenden Schicht wieder auskoppelt und nachweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationstiefe der Gitterschicht 3 bis 60 nm beträgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wellenleitende Schicht verwendet, deren Dicke kleiner als $\lambda/2$ ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der wellenleitenden Schicht von 40 bis 160 nm beträgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet

daß die Anregungsstrahlung unter einem anderen Winkel ausgekoppelt wird als die Lumineszenzstrahlung.

5. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Anregungsstrahlung in Rückwärtsrichtung in den Wellenleiter eingekoppelt wird und sowohl das durch den Wellenleiter transmittierte Anregungslicht als auch das im Wellenleiter transportierte Lumineszenzlicht in Vorwärtsrichtung ausgekoppelt wird.

6. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5,

dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungsstrahlung unter einem Winkel im Bereich zwischen $\pm 1^\circ$ und $\pm 50^\circ$ in den Wellenleiter eingekoppelt wird.

7. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß die in den Wellenleiter zurückgekoppelte Lumineszenzstrahlung unter einem Winkel zwischen $\pm 1^\circ$ und $\pm 50^\circ$ ausgekoppelt wird.

8. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 7,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Lumineszenz des Substrats unterdrückt wird.

9. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 8,

dadurch gekennzeichnet,

daß man zur Lumineszenzanregung im wesentlichen paralleles Licht verwendet.

10. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß man die zum Nachweis des Analyten benutzten lumineszenzfähigen Stoffe direkt an der Oberfläche der wellenleitenden Schicht immobilisiert.

11. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 10,

dadurch gekennzeichnet,

daß man auf der Oberfläche der Sensorplattform einen spezifischen Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für den Analyten selbst oder für einen

der Bindungspartner in einem mehrstufigen Assay, in dessen Verlauf der Analyt in einem der weiteren Teilschritte gebunden wird, immobilisiert.

12. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man gleichzeitig die Absorption des eingestrahlten Anregungslichtes bestimmt.

13. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Anregungslicht im "continuous wave" (cw) Betrieb in den Wellenleiter einstrahlt.

14. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Anregungslicht in Form eines zeitlichen Puls einstrahlt und die Lumineszenz zeitlich aufgelöst detektiert.

15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Pulsdauer von einer Pikosekunde bis zu 100 Sekunden einstellt.

16. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man, bei einer oder mehreren Frequenzen, das Anregungslicht intensitätsmoduliert einstrahlt und die resultierende Phasenverschiebung und Modulation der Probenlumineszenz detektiert.

17. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zu untersuchende Probe Eigelb, Blut, Serum, Plasma oder Urin ist.

18. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zu untersuchende Probe ein Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bioprozess- oder Synthesebrühe ist.

19. Verwendung des Verfahrens nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 18,

zur quantitativen Bestimmung von biochemischen Stoffen in der Affinitätssensorik.

20. Verwendung des Verfahrens nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 18, zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern oder Antigenen.

21. Verwendung des Verfahrens nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 18, zur quantitativen Bestimmung von Rezeptoren oder Liganden, Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymsubstraten, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

22. Verwendung des Verfahrens nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 18, zur selektiven quantitativen Bestimmung lumineszierender Bestandteile in optisch trüben Flüssigkeiten.

23. Optische Sensorplattform (1) zur Bestimmung der Lumineszenzstrahlung nach einem Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 22, umfassend ein im wesentlichen planares optisch transparentes Substrat (5), auf das eine dünne wellenleitende Schicht (4) aufgebracht ist, wobei die Sensorplattform (1) mit einem Koppelgitter (2) zur Einkopplung der Anregungsstrahlung versehen ist und die Brechzahl des Substrats kleiner ist als die Brechzahl der wellenleitenden Schicht (4), wobei die Dicke der wellenleitenden Schicht (4) kleiner ist als die Wellenlänge λ der anregenden Strahlung, und die wellenleitende Schicht (4) aus einem Material besteht, dessen Brechzahl bei der Wellenlänge des Anregungslichts $> 1,8$ ist und die Sensorplattform (1) zur Auskopplung der in die wellenleitende Schicht rückgekoppelten Lumineszenzstrahlung ein von dem ersten Koppelgitter (2) räumlich getrenntes zweites Koppelgitter (3) aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationstiefe des Gitters 3 bis 60 nm beträgt.

24. Sensorplattform nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Dicke der wellenleitenden Schicht (4) kleiner als $\lambda/2$ ist.

25. Sensorplattform nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Dicke der wellenleitenden Schicht (4) 40 bis 160 nm beträgt.

26. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Gitterkonstante des ersten Koppelgitters (2) zur Einkopplung der Anregungsstrahlung verschieden ist von der Gitterkonstante des zweiten Koppelgitters (3) für die Auskopplung der Lumineszenzstrahlung.

27. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Gitterabstand $B \leq 3 \cdot X_{1/e}$ ist, wobei $X_{1/e}$ die Länge bezeichnet, innerhalb derer die Intensität I_0 der auftreffenden Strahlung auf I_0/e abgefallen ist.

28. Sensorplattform nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Gitterabstand $B \geq 0,2 \cdot X_{1/e}$ ist.

29. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß zwischen Trägermaterial (5) und wellenleitender Schicht (4) eine niedrigbrechende Zwischenschicht zur Unterdrückung der Lumineszenz des Substrats angeordnet ist.

30. Sensorplattform nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß die niedrigbrechende Zwischenschicht im wesentlichen aus SiO_2 oder $\text{SiO}_x\text{C}_y\text{H}_z$ besteht.

31. Sensorplattform nach Anspruch 29 oder 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Dicke der Zwischenschicht $\leq 1000 \text{ nm}$ ist.

32. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,

daß ein organisches, mikrostrukturiertes Substrat verwendet wird.

33. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 32,
dadurch gekennzeichnet,

daß ein anorganisches Substrat mit einer mikrostrukturierten organischen Beschichtung
verwendet wird.

34. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 33,

daß die planare, transparente, wellenleitende Schicht (4) aus Ta_2O_5 oder TiO_2 besteht.

35. Sensorplattform nach wenigstens einem der Ansprüche 23 bis 34,

dadurch gekennzeichnet,

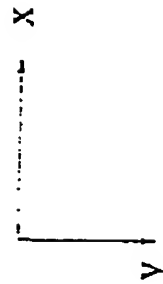
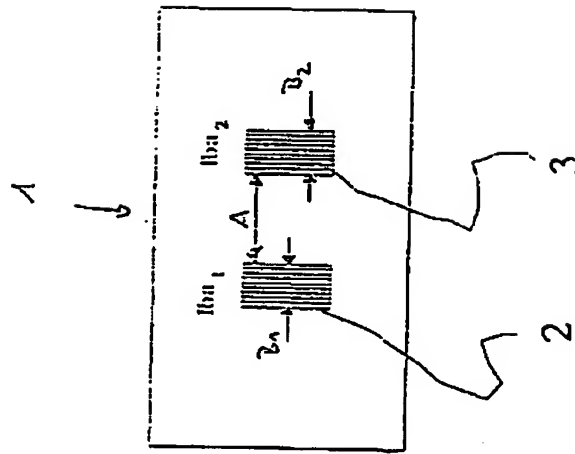
daß sich zwischen wellenleitender Schicht (4) und Probe eine Haftvermittlungsschicht be-
findet.

36. Sensorplattform nach Anspruch 35 ;

dadurch gekennzeichnet,

daß die Dicke der Haftvermittlungsschicht ≤ 50 nm ist.

Fig. 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.